西藏地区结直肠癌中 SMARCA4、BRAF、p53、PD-1、PD-L1 免疫组化表达及 $BRAF^{V600E}$ 和 NTRK 基因改变情况

罗含欢[1]，刘斌云[2]，霍真[3]，边巴扎西[4]，王倩[1]，多布啦[1]，尼玛卓玛[1]，

达珍[1]，王寒[1]，郭平平[1]

1 西藏自治区人民医院病理科，拉萨 850000

2 西藏高原医学研究所，拉萨 850000

3 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科，北京 100730

4 西藏自治区人民医院普外科，拉萨 85000

通信作者：霍真 电话：010-69159365，电子邮件：huozhen1976@126.com

基金项目：西藏自治区自然科学基金（项目编号：XZ202101ZR0095G）

摘要：目的 研究西藏地区手结直肠癌中 SMARCA4、BRAF、p53、程序性死亡受体 1（programmed death-1，PD-1）及其配体 1 （programmed death-ligand 1，PD-L1）免疫组化表达和 BRAF、神经营养性酪氨酸激酶受体（neurotrophin tyrosine kinase receptor，NTRK）基因改变情况，为西藏地区结直肠癌患者靶向治疗及免疫治疗提供依据。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2021 年 7 月期间西藏自治区人民医院经手术切除病理确诊为结直肠癌病例 64 例，全部病例均进行 SMARCA4、BRAF、p53、PD-1、PD-L1 免疫组化染色和 NTRK1、NTRK2、NTRK3 融合基因荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization ，FISH)检测及 BRAF V600E 基因突变聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测。**结果** 64 例结直肠癌病例，男女比例 1.21:1，平均年龄(56.59±13.27)岁。46 例(46/64，

71.88%）位于结肠，18 例（18/64，28.12%）位于直肠。60 例（60/64，93.75%）为腺癌， 4 例（4/64，6.25%）为其他类型。11 例（11/64，17.19%）为 T1 或 T2 期， 53 例（53/64，82.81%）为 T3 或 T4 期； 24 例（24/64，37.50%）出现淋巴结转移。免疫组化方面，1 例（1/64，1.56%）SMARCA4 部分肿瘤细胞表达减弱或缺失，4 例（4/64,6.25%）BRAF 肿瘤细胞阳性表达，35 例（35/64，54.69%）p53 为突变型表达。45 例（45/64,70.31%）肿瘤背景免疫细胞 PD-1 阳性表达占比<10%，19 例（19/64，29.69%）肿瘤背景免疫细胞 PD-1 阳性表达占比≥10%。52 例（52/64，81.25%）PD-L1 占比评分（CPS）<10，12 例（12/54，18.75%）≥10。64 例 NTRK1、NTRK1、NTRK1 融合基因检测均为阴性；4 例（4/64，6.25%）检测到 BRAF V600E 基因突变；1 例 SMARCA4 表达缺失病例未检测到 SMARCA4 基因改变。PD-L1 的表达高低与有无错配修复缺陷/高度微卫星不稳定和 PD-1 的表达高低之间的差异有统计学意义（P=0.001)。**结论** 西藏地区结直肠癌中罕见出现 SMARCA4 表达减弱或缺失及 NTRK 融合基因改变，少数病例有 BRAF V600E 基因突变，Pan-TRK 和 BRAF 免疫组化可作为 NTRK 融合基因及 BRAF 基因突变的初筛方法。错配修复缺陷/高度微卫星不稳定的病例中更容易出现 PD-L1 蛋白高表达，这部分患者有望获益于免疫治疗。PD-1 的高表达和 PD-L1 的高表达呈正相关。

关键词：西藏地区；结直肠癌；免疫组织化学；荧光原位杂交；聚合酶链反应；SMARCA4；PD-1；PD-L1；BRAF V600E；NTRK

Immunohistochemical expression of SMARCA4, BRAF, p53, PD-1, PD-L1 and $BRAF^{V600E}$, NTRK gens changes in colorectal cancer in Tibet

LUO Hanhuan[1], LIU Bingyun[2], HUO Zhen[3], BIANbazaxi[4], WANG Qian[1], DUObula[1],

NImazhuoma[1], DA Zhen[1], WANG Han[1], GUO Pingping[1]

[1]Department of Pathology, Tibet Autonomous Region People' s Hospital, Lhasa 850000, China

[2]High Altitude Research Institute of Tibet Autonomous Region, Lhasa 850000, China

[3]Department of Pathology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

[4]Department of General Surgery, Tibet Autonomous Region People' s Hospital, Lhasa 850000, China

Corresponding author: HUO Zhen TEL: 010-69159365, E-mail: huozhen1976@126.com

ABSTRACT: **Objective** To study the expression of SMARCA4, BRAF, p53, programmed death receptor 1 (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1), and BRAF and neurotrophin tyrosine kinase receptor (NTRK) genes changes in colorectal cancer in Tibet. **Methods** A total of 64 patients with colorectal cancer resected in Autonomous Region People's Hospital from January 2015 to July 2021 was enrolled in this study. The expression of SMARCA4, BRAF, p53, PD-1, PD-L1 was detected by immunohistochemical(IHC) staining, and detection of NTRK1, NTRK2, NTRK3 fusion gene by fluorescence in situ hybridization (FISH), BRAF V600E gene mutation by polymerase chain reaction (PCR). **Results** 64 cases of colorectal cancer, with a male to female ratio of 1.21:1 and the mean age of (56.59 ± 13.27) years. 46 cases (46/64, 71.88%) were located in the colon, and 18 cases (18/64, 28.12%) were in the rectum. 60 cases (60/64, 93.75%) were adenocarcinoma, and 4 cases (4/64, 6.25%) were other types. 11 cases (11/64, 17.19%) were in

T1 or T2 phase, and 53 cases (53/64, 82.81%) were in T3 or T4 phase; 24 cases (24/64, 37.50%) were found lymph node metastasis. The IHC staining showed that SMARCA41 was partial expression reduced or missing in a case (1/64, 1.56%), BRAF were positive in 4 cases (4/64,6.25%), p53 showed mutant expression pattern in 35 cases (35/64,54.69%). PD-1 expression <10% of tumour background immune cells in 45 cases (45/64,70.31%) , and ⩾ 10% in 19 cases（19/64,29.69%）. PD- L1 proportion Score （CPS）<10 in 52 cases(（52/64，81.25%）, and ⩾ 10 in 12 cases（12/54,18.75%）.None case was detected the fusion genes of NTRK1, NTRK1, and NTRK1, and four cases were detected BRAF V600E gene mutations. No SMARCA4 gene changes was detected in one case with SMARCA4 partial expression missing. The difference between the PD-L1 expression proportion score and the status of mismatch repair /microsatellite instability (MMR/ MSI), as well as the expression level of PD-1 was statistically significant (P=0.001). **Conclusions** SMARCA4 expression reduced or missing and NTRK fusion gene are rare in colorectal cancer in Tibet. A few cases have BRAF V600E gene mutations, and Pan-TRK and BRAF expression can be used as initial screening methods for NTRK fusion gene and BRAF gene mutation. Cases with mismatch repair deficiency / microsatellite instability-high (dMMR/MSI-H) are more prone to high expression of PD-L1 protein, and the patients with dMMR/MSI-H may benefit from immunotherapy. The high expression of PD-1 is positively correlated with the high expression of PD-L1.

Key words： Tibet; Colorectal; Immunohistochemistry; Fluorescence in situ hybridization; PCR; SMARCA4；PD-1；PD-L1；BRAF V600E；NTRK

结直肠癌（Colorectalcancer，CRC）是全球最常见的恶性肿瘤之一，在美国癌症协会公布的《2021 年度癌症统计报告》[1]中，CRC 的发病率及病死率均位于第三。随着生活水平的提高，饮食习惯和结构的改变，以及人口的老龄化，结直肠癌在我国发病率呈逐年上升趋势，中国 2020 年结直肠癌的新发病例数为 56 万例，因结直肠癌死亡病例达 29 万例[2]随着分子检测技术的发展，已证实 CRC 发病主要有两种途径：一条是以癌基因和抑癌基因为代表的染色体不稳定性途径，如癌基因 KRAS、BRAF、PIK3 等，以及抑癌基因 P53、APC、DPC4 等；另一条是因错配修复基因突变失活或甲基化失活导致的微卫星不稳定性途径[3-4]。近年来免疫检查点抑制剂在恶性肿瘤治疗方面取得突破性进展，是目前的研究热点之一。本研究纳入 2015 年 1 月至 2021 年 7 月西藏自治区人民医院经手术切除病理确诊的结直肠癌病例，采用光镜、免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）、荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）和聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测等方法，总结分析西藏高原地区藏族人群结直肠癌中 SMARCA4、BRAF、P53、程序性死亡受体 1（programmed death-1，PD-1）、程序性死亡受体配体 1 （programmed death-ligand 1，PD-L1）表达情况，及 BRAF 和神经营养性酪氨酸激酶受体（neurotrophin tyrosine kinase receptor，NTRK）基因改变情况，为西藏地区结直肠癌患者的靶向治疗及免疫治疗提供依据。

资料和方法

资料来源 收集2015年1月至2021年7月西藏自治区人民医院病理科存档的经手术切除确诊的结直肠癌病例64例，并查阅临床和病理资料。本研究通过西藏自治区人民医院伦理委员会审批（伦理审查编号：ME-TBHP-KJ-23-03）。

方法 所有病理切片由2名病理科副主任医师重新阅片，按照2019年世界卫生组织消化系统肿瘤分类标准[5]进行病理分型及分级。采用IHC EnVision法检测PD-L1（克隆号：22C3，安捷伦科技有限公司）、 PD-1（克隆号：UMAB199，中杉金桥公司）、SMARCA4（克隆号：GR005，基因科技上海股份有限公司）、BRAF（克隆号：EPR2208Y）、Ki-67(克隆号：MIB-1)、p53（克隆号：DO-7），后三种均为安必平医药科技股份有限公司， 同时设立阳性和阴性对照。NTRK1、NTRK2、NTRK3基因断裂探针试剂(荧光原位杂交法)购于北京安必平生物科技有限公司，BRAF V600E基因突变检测试剂（荧光PCR法）购于厦门艾德生物医药科技股份有限公司，均按照说明书方法进行操作。

结果判读 SMARCA4、p53和Ki-67细胞核出现棕褐色颗粒判读为阳性，未出现棕褐色颗粒为阴性；p53突变情况根据细胞核着色情况判定，结果判断参照文献[6-7]，其中肿瘤细胞核均无着色提示无义突变，>60%的肿瘤细胞核强着色提示错义突变，1%-60%肿瘤细胞不均匀着色提示野生型，还有文献[8]报道的少数病例中出现p53细胞质着色模式，在本组病例中未观察到，此种情况的判读标准本研究不涉及。BRAF、PD-1细胞质出现棕褐色颗粒判读为阳性，未出现棕褐色颗粒为阴性；PD-L1细胞膜/细胞质出现棕褐色颗粒判读为阳性，未出现棕褐色颗粒为阴性，PD-L1表达按照CPS综合阳性评分进行表达分级，CPS计数方法为PD-L1染色细胞数（肿瘤细胞、淋巴细胞、巨噬细胞）除以活的肿瘤细胞总数，再乘以

100 得出，根据 CPS 是否大于 10 分为两组，CPS<10 和 CPS≥10。NTRK1、NTRK2、NTRK3 在 100 倍油镜下观察 FISH 荧光信号，判读标准：计数 100 个互不重叠的肿瘤细胞核，当红色荧光信号和绿色荧光信号发生分离式，记为 NTRK 基因断裂。突变扩增阻滞系统技术 (amplification refractory mutation system, ARMS)-PCR 反应严格按 BRAF V600E 基因突变检测试剂盒的说明书进行加样和操作，均设置阳性及阴性对照。

统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件，符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距表示；分类变量以频数和频率表示。PD-L1 与性别、年龄、病理特征等相关参数之间的关系差异比较采用卡方检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

一般情况 64 例西藏自治区人民医院手术切除 CRC 患者中，男 35 例，女 29 例，男女比例为 1.21:1，年龄 24 岁-83 岁，平均年龄（56.59±13.27）岁，其中 38 例（38/64，59.38%）年龄≤60 岁，26 例（26/64，40.63%）年龄>60 岁，均为藏族。46 例（46/64,71.88%）为结肠占位,其中 24 例（24/46，52.17%）位于右半结肠，22 例（22/46，47.83%）位于左半结肠；18 例（18/64，28.12%）为直肠占位。

病理特征 病理类型上，64 例 CRC 病例中 60 例（60/64，93.75%）为腺癌(**图 1-4**)， 其中 26 例（26/60，43.33%）为高/中分化腺癌，34 例（34/60，56.67%）为低分化腺癌；4 例（4/64，6.25%）为其他类型，1 例未分化癌，1 例 腺鳞癌 ，1 例小细胞癌 ，1 例混合腺癌和小细胞癌。肿瘤分期上，11 例（11/64，17.19%）为 T1 或 T2 期， 53 例（53/64，82.81%）为 T3 或 T4 期。淋巴结转移方面，24

例（24/64，37.50%）出现淋巴结转移，40 例（40/64，62.50%）未出现淋巴结转移。

免疫组化结果 64 例病例均进行 IHC 染色，64 例（64/65，98.44%）SMARCA4 肿瘤细胞为强阳性表达，仅有 1 例（1/64，1.56%）SMARCA4 部分肿瘤细胞表达减弱或缺失（**图 5**）；4 例（4/64,6.25%）BRAF 肿瘤细胞阳性表达（**图 6**）；35 例（35/64，54.69%）p53 为突变型表达模式（**图 7**），其中 24 例（24 例 24/35，68.57%）为错义突变型表达模式，11 例（11/35，31.43%）为无义突变型表达模式。1 例 PD-1 肿瘤细胞阳性表达，45 例（45/64，70.31%）肿瘤背景免疫细胞 PD-1 阳性表达占比<10%，19 例（19/64，29.69%）≥10%（**图 8**）。52 例（52/64，81.25%）病例 PD-L1 综合评分 CPS<10（**图 9**），12 例（2/64，18.75%）CPS≥10（**图 10**）。64 例病例中肿瘤细胞 Ki-67 增殖指数从 15%到 90%（平均 57.89%）。此外，全部病例均进行 Pan-TRK 和错配修复蛋白 IHC 染色，详见笔者既往研究数据[9]，10 例出现错配修复蛋白表达缺失（10/64，15.63%），提示错配修复缺陷/高度微卫星不稳定性（mismatch repair deficiency / microsatellite instability-high ，dMMR/MSI-H）64 例 Pan-TRK 表达均为阴性。

基因检测结果 64 例均进行 NTRK1、NTRK2、NTRK3 融合基因 FISH 检测，均未见阳性信号（**图 11**）。64 例均进行 BRAF V600E 基因突变检，4 例（4/64，6.25%，**图 12**）发现 BRAF V600E 基因突变（均为 BRAF IHC 阳性病例）。1 例 SMARCA4 免疫组化肿瘤细胞部分表达减弱或缺失的病例进行了二代测序，未发现 SMARCA4 基因改变。

统计学结果 PD-L1 在 CRC 中的表达与患者年龄、性别、原发部位、分化程度、肿瘤浸润程度、淋巴结转移与否均无关（P>0.05）。与 dMMR/MSI-H 和 PD-1 的高表达呈正相关（P<0.05）（详见表 1）。

讨 论

CRC 作为最常见的消化道恶性肿瘤之一，其发病机制尚未完全明确[10]。大部分 CRC 患者诊断时已发生转移，预后较差。目前 CRC 的传统治疗方法主要是手术、化疗和放疗。虽然显著改善了患者的预后，但 CRC 的死亡率、复发率并未显著降低。因此，探索新的治疗方式来减少术后复发的风险和死亡率，是 CRC 领域的研究重点。

近年肿瘤微环境逐渐被重视，肿瘤免疫逃逸在肿瘤增殖、复发和转移过程中发挥着关键作用，肿瘤细胞和免疫微环境之间的关系是研究的热点，应用免疫检查点抑制剂调节免疫功能逐渐成为一种新兴的治疗方法[11]。程序性死亡受体 1（programmed death-1，PD-1）及其配体 1（programmed death-ligand 1，PD-L1）作为一对负性免疫共刺激分子，在肿瘤免疫逃逸中发挥着重要作用。研究发现在肿瘤细胞表面 PD-L1 表达缺失，而肿瘤间质细胞表达 PD-L1 的小鼠中，应用 PD-L1 /PD-1 抑制剂依然能抑制肿瘤的免疫逃逸反应，提示肿瘤间质细胞表达 PD-L1 在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用[12]。巨噬细胞可通过表达 PD-L1 与 T 淋巴细胞表面 PD-1 结合，抑制 T 淋巴细胞增殖和活化，并诱导效应 T 细胞凋亡，导致 T 淋巴细胞对肿瘤细胞杀伤作用下降，引起肿瘤细胞免疫逃逸[13]。近年来国内外许多相关研究表明，PD-1 /PD-L1 信号通路可能通过诱导 T 细胞外周耐受、凋亡、功能衰竭以及抑制 T 细胞增殖、共刺激信号失衡等诸多方面来发挥肿瘤细胞的免疫逃逸作用[14]。针对 PD-1/PD-L1 的免疫治疗在黑色素瘤和肺

癌等多种恶性肿瘤中，均能显著抑制晚期肿瘤的进展，延长患者的生存期，被推荐应用于晚期、发生转移以及不适合一线多药物化疗的肿瘤患者[11]，这也为晚期 CRC 患者的治疗带来希望[15]。越来越多的研究提示，抗 PD-1/PD-L1 免疫治疗在 dMMR/MSI-H 的 CRC 患者治疗中已取得显著疗效。但针对 PD-1 和 PD-L1 信号通路在 CRC 中的表达及其相关调控机制的研究较少，部分研究报道[16]PD-L1 在 CRC 中的表达与患者年龄、性别、发生部位、淋巴结转移与否、肿瘤浸润程度均无关,与肿瘤分化程度相关，在低分化组中的 PD-L1 阳性表达率明显高于高、中分化组，差异有统计学意义。另有研究报道[17]（文献 13）是否淋巴结转移、不同临床病理分期、不同肿瘤 T 分期以及不同肿瘤分化程度患者 PD-L1 蛋白的表达差异有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$）。本组研究显示 PD-L1 在结直肠腺癌中的表达与患者年龄、性别、原发部位、分化程度、肿瘤浸润程度、淋巴结转移与否均无关($P>0.05$),与 dMMR/MSI-H 和高表达 PD-1 呈正相关($P<0.05$),与部分文献报道一致[16]。

CRC 发病是一个在多种因素作用下基因不断突变导致细胞异常增殖的过程。近年来，CRC 治疗已进入靶向治疗时代,其中 EGFR 基因是临床上治疗 CRC 的主要靶点之一，而 KRAS 和 BRAF 基因是否突变与 EGFR 靶向治疗密切相关[18]。2021 版《结直肠癌分子检测高通量测序中国专家共识》中对于确诊的 CRC 患者，应检测 KRAS 和 BRAF 基因表达情况，以便对预后进行分层，指导临床治疗[19]。准确检测 CRC 中 KRAS 及 BRAF 的基因状态非常关键。BRAF 基因突变主要为第 11 外显子及 15 外显子上的突变，第 15 外显子上的 V600E 密码子突变约占突变类型的 90%[20]。BRAF 基因突变与多种肿瘤的发生发展过程密切相关，并可作用肿瘤预后的标志物之一[21]。国内外报道的结直肠癌中 BRAF 基因突变率为

4% ～ 13%[22]。研究[23]表明 BRAF 基因突变型 CRC 患者无法从抗 EGFR 单抗治疗中获益，而且 BRAF 基因突变的转移性 CRC 预后差，突变患者无进展生存期和总生存期较野生型的患者明显缩短。本组研究 BRAF V600E 的突变率为 6.25%，与文献报道的基本相符。BRAF 基因突变型 CRC 在患者性别、肿瘤分化程度、是否远处转移和淋巴结转移、肿瘤部位和肿瘤分期等方面的特点文献报道不一致，有研究发现[24]BRAF 基因突变与 CRC 肿瘤浸润深度和分化程度相关，在肿瘤浸润深度 为 T4 和低分化的 CRC 患者中，BRAF 基因突变率较高。本组研究中 4 例 BRAF 突变的病例 3 例为女性，4 例病理类型均为低分化腺癌，浸润深度 T3/T4，均可见脉管浸润，3 例有淋巴结转移，与部分文献报道一致。由于样本量局限性，我们将继续收集病例进一步研究总结 BRAF 突变型 CRC 的特点并完善 KRAS 等相关基因的检测。

NTRK 基因融合作为另一种重要的在多种实体瘤中表达的融合基因类型备受关注，NTRK 基因融合的患者可从 NTRK 抑制剂（拉罗替尼）中获益。笔者前期的研究显示西藏地区 CRC 病例中均未发现 Pan-TRK 蛋白的表达[9]，为了更准确的判读西藏地区 NTRK 融合基因情况，以及 NTRK 基因改变与 Pan-TRK 免疫组化表达之前的关系，本组研究对全部 64 例病例均进行了 NTRK、NTRK2、NTRK3 融合基因检测，结果均为阴性，与笔者之前研究显示全部病例 Pan-TRK 免疫组化均为阴性结果相一致[9]，提示西藏地区 NTRK 基因融合的发生频率极低，Pan-TRK 免疫组化可以作为 NTRK 融合基因改变的初筛方法。本研究病例数有限，后续有待扩大病例数进一步深入研究。

SMARCA4 蛋白是 SWI/SNF 复合物，是 ATP 依赖性染色体重塑复合物家族成员，具有解旋酶和 ATP 酶活性，可以促进染色体构象发生改变，对基因转录进行调控。

SWI/SNF 复合物在转录调控中的功能主要为增殖和分化，相关肿瘤的形态特征表现为分化差和高度增殖，表明其主要缺陷是未能激活促进或维持终末分化的基因。SMARCA4 蛋白在正常组织中表达，其在胸部肉瘤、胃食管交界及胃未分化癌等多种肿瘤中可出现表达缺失[25-26]。在胃肠道 SWI/SNF 复合物缺失性肿瘤中，主要是出现 SMARCA4 缺失，占到 63%[27]。SMARCA4 表达缺失的肿瘤通常分化差，在病理形态学上多表现为去分化、小细胞和横纹肌样特征。有研究显示 SMARCA4 缺失型肿瘤与免疫缺陷的微环境相关，从而导致患者不能从免疫检查点抑制剂中获益[28]。SMARCA4（BRG1）免疫组化染色可能更有助于预测 SMARCA4 的缺失情况[29]，但 SMARCA4 蛋白表达缺失与基因改变情况并不完全对应，大多数 SMARCA4 表达缺失的病例中可发现 SMARCA4 基因改变，出现 SMARCA4 基因改变不一定会出现蛋白表达缺失。本组仅 1 例病例出现 SMARCA4 部分肿瘤细胞的表达减弱或缺失，二代测序检测并未发现 SMARCA4 基因突变，该病例病理类型为中分化腺癌，并没有去分化和横纹肌样的形态学特点，目前文献缺乏这种情况的相关报道，如何解释这种现象，需要积累类似病例并进一步深入研究。

P53 是一种抑癌基因，其编码蛋白为 53KDa，被命名为 p53，其在正常细胞中可以诱导细胞周期阻断在 G0 /G1 期，使细胞程序性凋亡，发生突变时失去监管作用，引起细胞周期异常，出现细胞增殖过多、凋亡减少，从而促进肿瘤的进展[30]。P53 抑癌基因是人类研究最早、最多且最易发生突变的肿瘤相关基因之一，约半数的恶性肿瘤 P53 基因突变，P53 在 CRC 中的突变率约为 40%-50%[31]。P53 基因突变时出现 p53 蛋白的异常表达，文献报道可以出现以下多种异常表达模式，主要表现为胞核异常表达，胞核异常表达有以下几种模式[6-7]，一种为全部肿瘤细胞均不表达 p53 蛋白，为无义突变型表达模式； 一种超过 60%的肿

瘤细胞强阳性表达，为错义突变型模式，少数病例可以出现胞质异常表达[8]。还有少数文献[32]报道在神经内分泌肿瘤可以出现局部区域的弥漫强阳性表达，也检测到 P53 基因突变。本组研究中没有观察到局部胞核弥漫强阳性表达和胞质表达两者情况。本组研究中 54.69%病例出现 p53 突变型表达，以错义突变型表达模式为主，占到 2/3 以上。CRC 中 p53 与 PD-L1 表达情况的相关研究不多，有研究显示 PD-L1 水平与 P53 突变情况无关，也有研究显示 P53 野生型 CRC 中 PD-L1 表达水平较高，提示 P53 野生型 CRC 患者可能具有更好的免疫治疗前景[31]，本组研究数据显示 P53 突变与 PD-L1 表达情况无相关性。

综上所述，西藏地区结直肠癌中罕见出现 SMARCA4 表达减弱或缺失及 NTRK1、NTRK2、NTRK3 融合基因改变，少数病例出现 BRAF V600E 基因突变，Pan-TRK 和 BRAF 免疫组化可作为 NTRK 融合基因及 BRAF 基因突变的初筛方法。错配修复缺陷/高度微卫星不稳定的病例中更容易出现 PD-L1 蛋白高表达，这部分患者有望获益于免疫治疗。PD-1 的高表达和 PD-L1 的高表达呈正相关。

图例说明

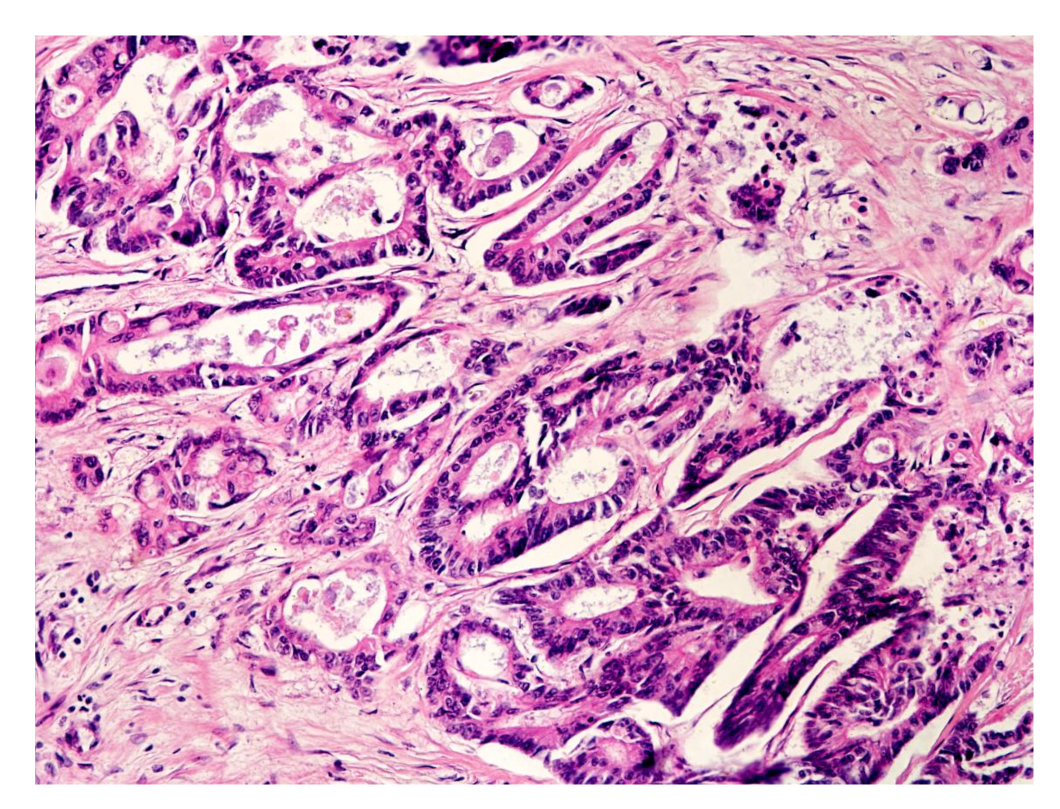


图 1 高分化腺癌（HE 染色 x100）

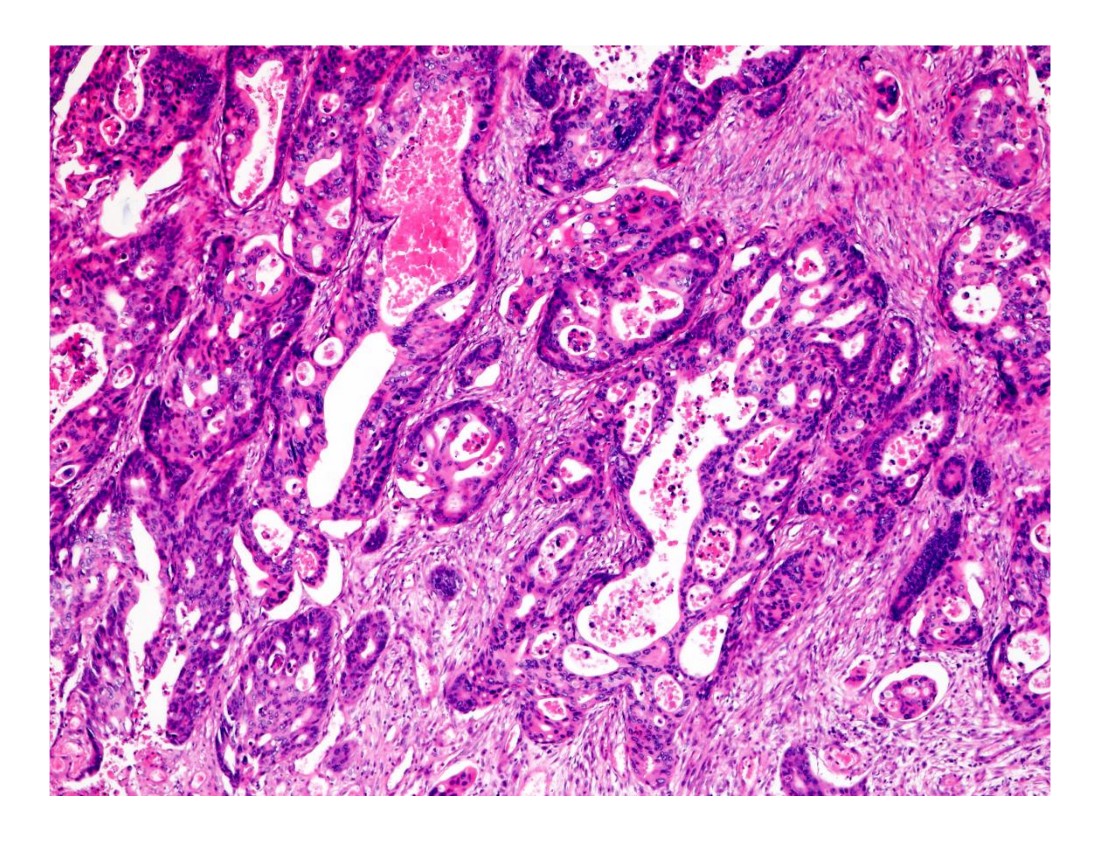


图 2 中分化腺癌（HE 染色 x40）

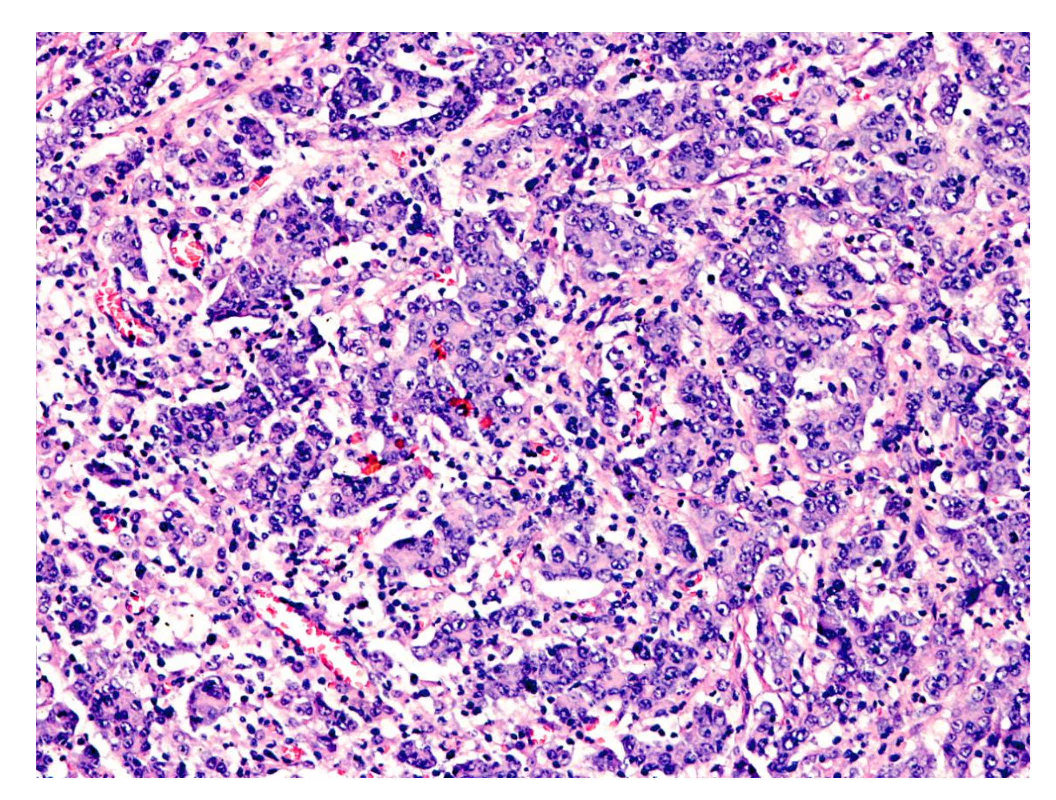


图 3 低分化腺癌，部分为微乳头状癌（HE 染色 x100）

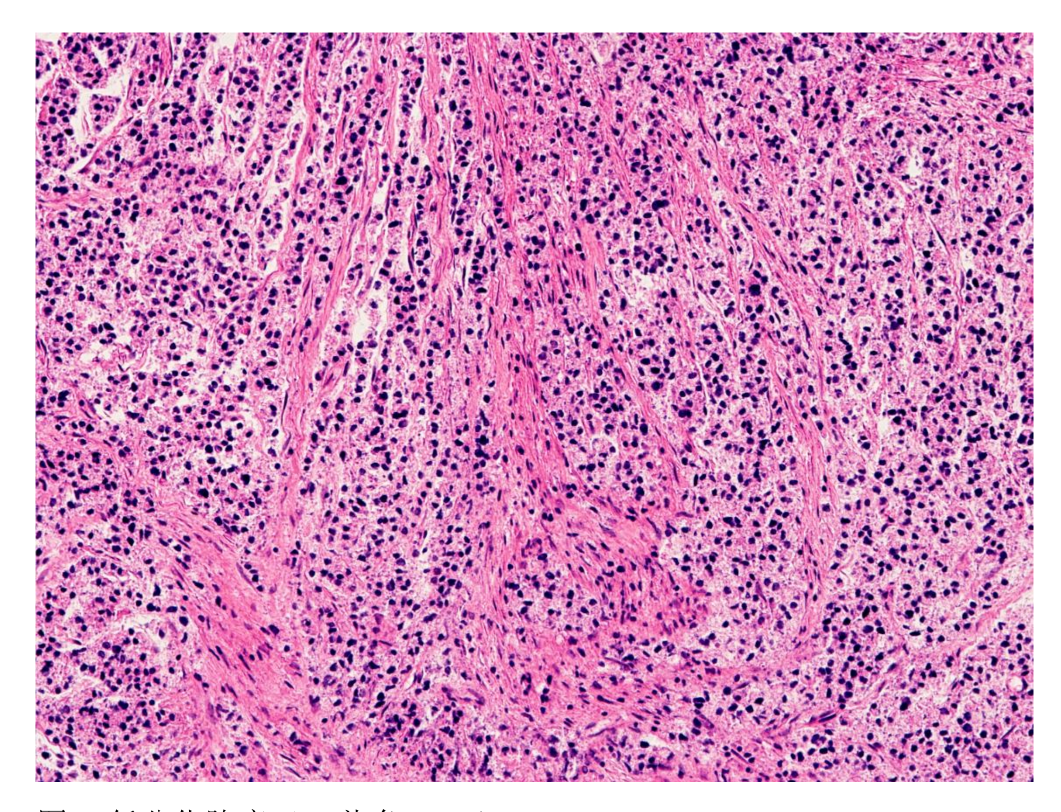


图 4 低分化腺癌（HE 染色 x100）

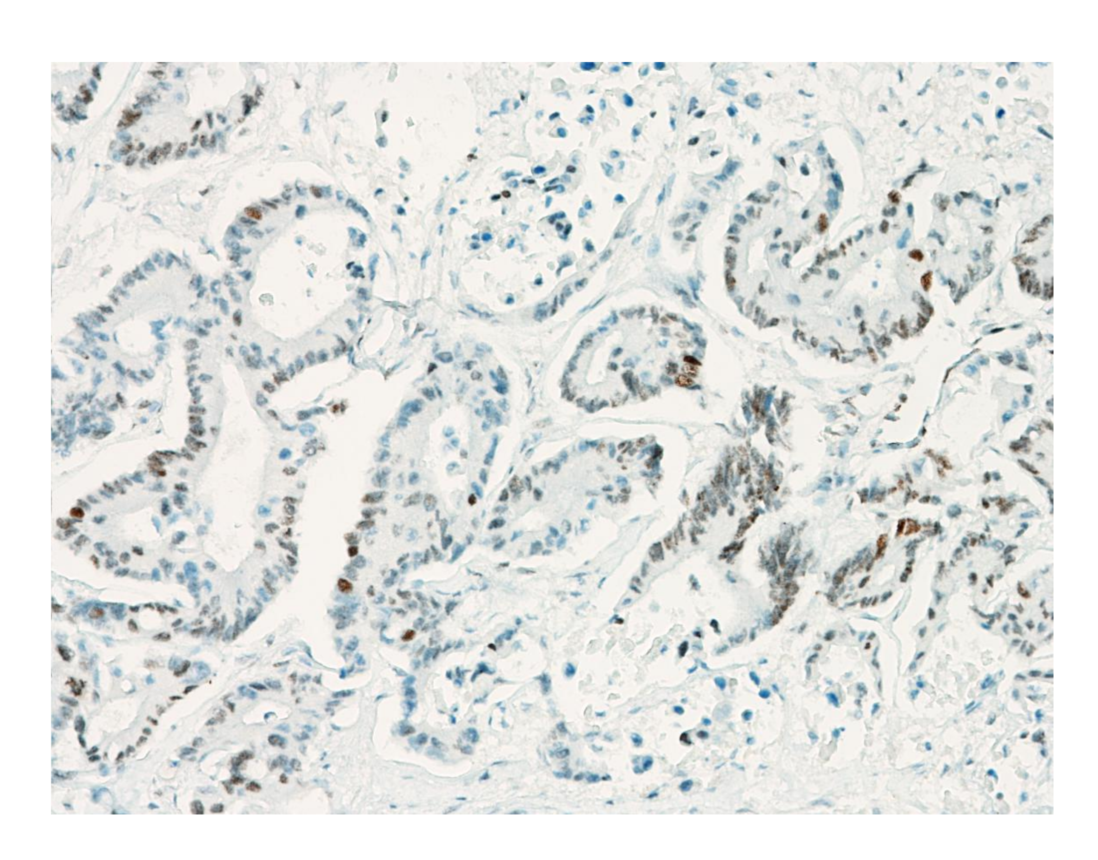


图 5 SMARCA4 免疫组化染色显示部分肿瘤细胞表达减弱或缺失（与图 1 为同一患者，x100）

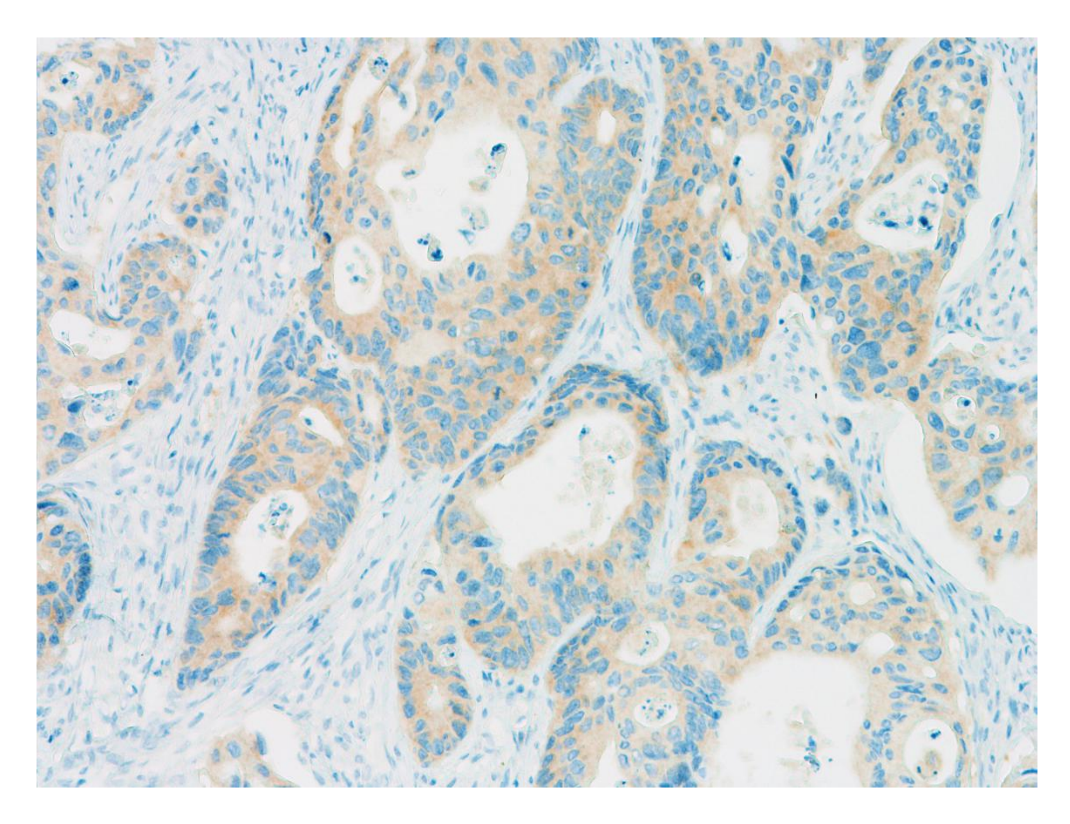


图 6 BRAF 免疫组化染色显示肿瘤细胞阳性表达（与图 2 为同一患者，x100）

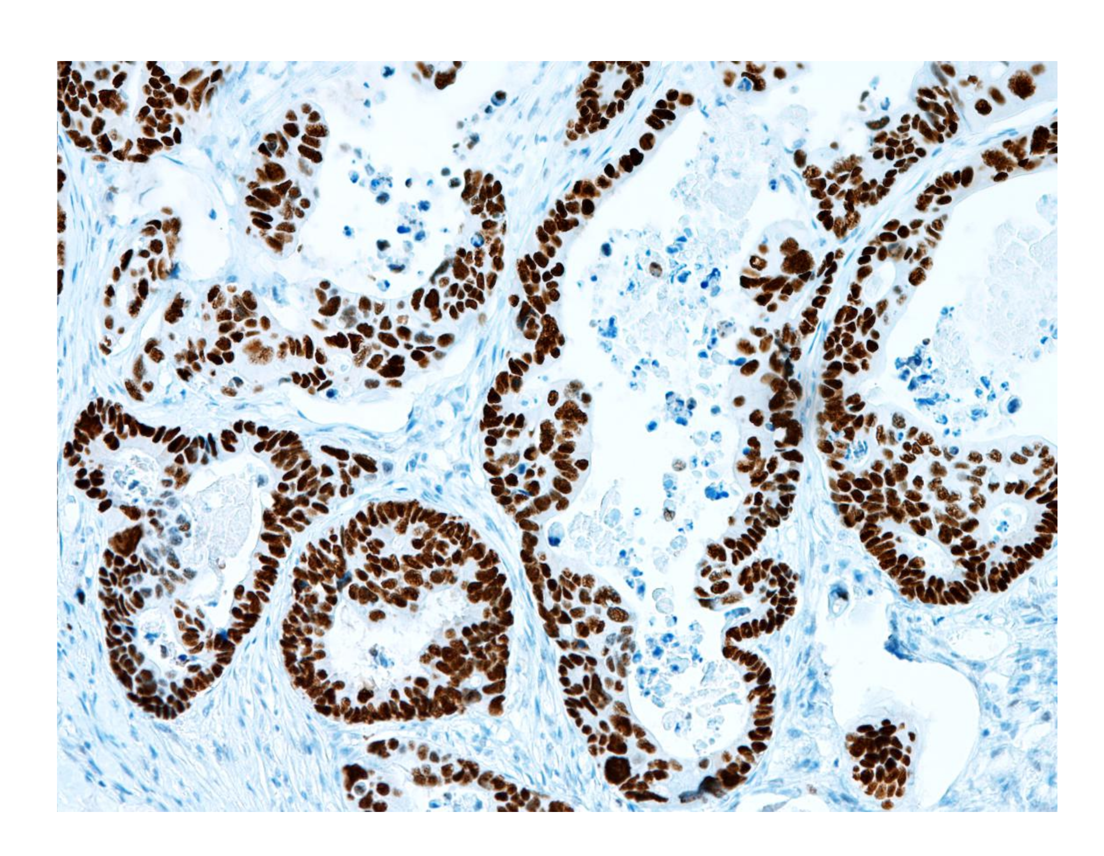


图 7 p53 免疫组化染色显示肿瘤细胞弥漫性强阳性表达，为错义突变型表达模式。（与图 2 为同一患者，x100）

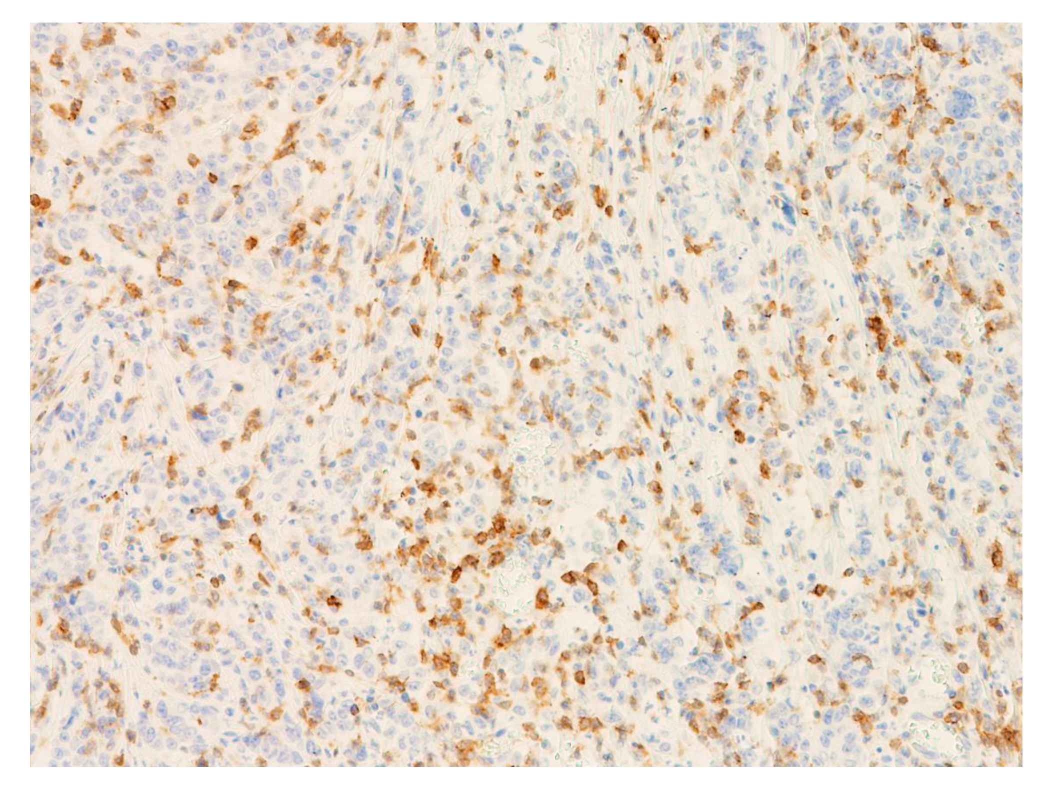


图 8 PD-1 免疫组化染色显示肿瘤细胞阴性，部分肿瘤背景免疫细胞（占比≥10%）阳性表达（与图 3 为同一患者，x100）

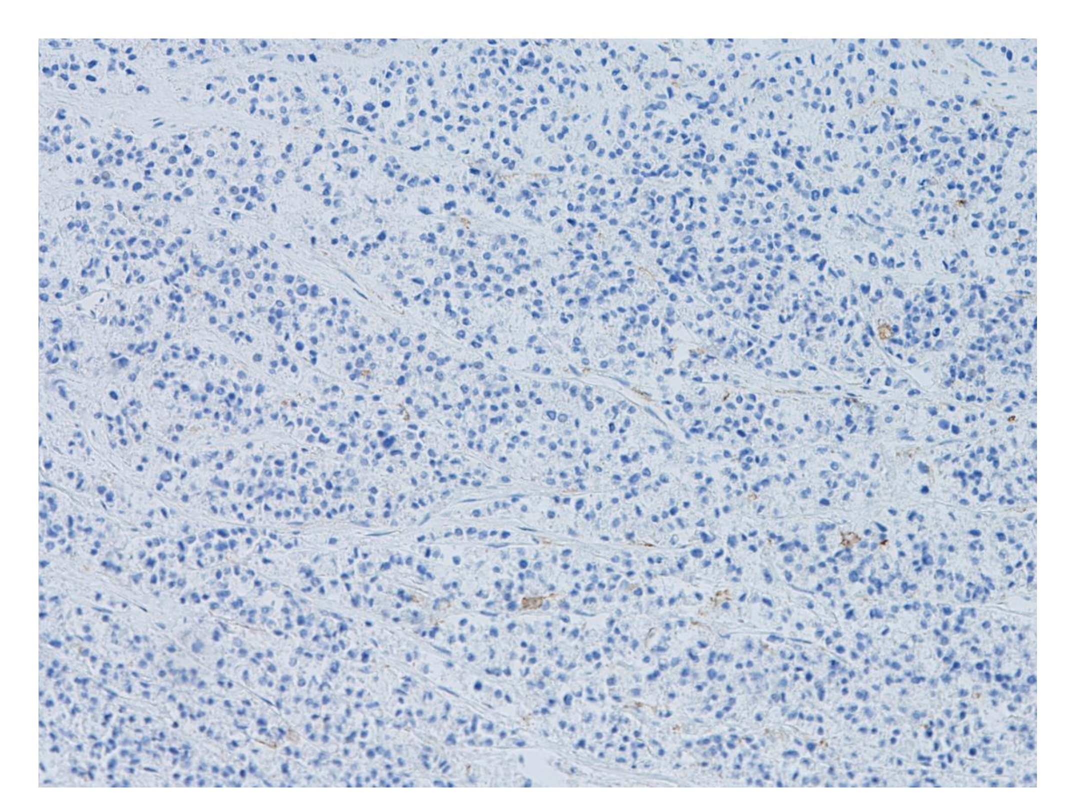


图 9 PD-L1 免疫组化染色显示个别肿瘤背景免疫细胞阳性表达,CPS 综合评分<10（与图 4 为同一患者，x100）

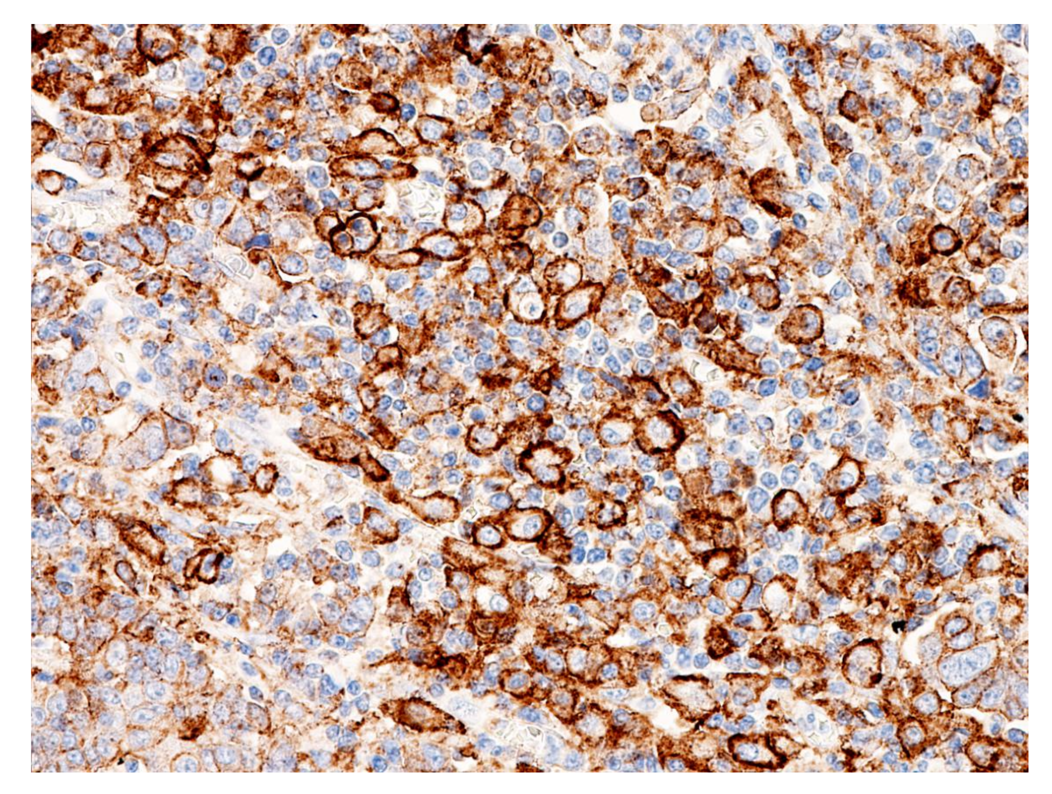


图 10 PD-L1 免疫组化染色显示部分肿瘤细胞和背景免疫细胞阳性表达，CPS 综合评分≥10（与图 3 为同一患者，x200）

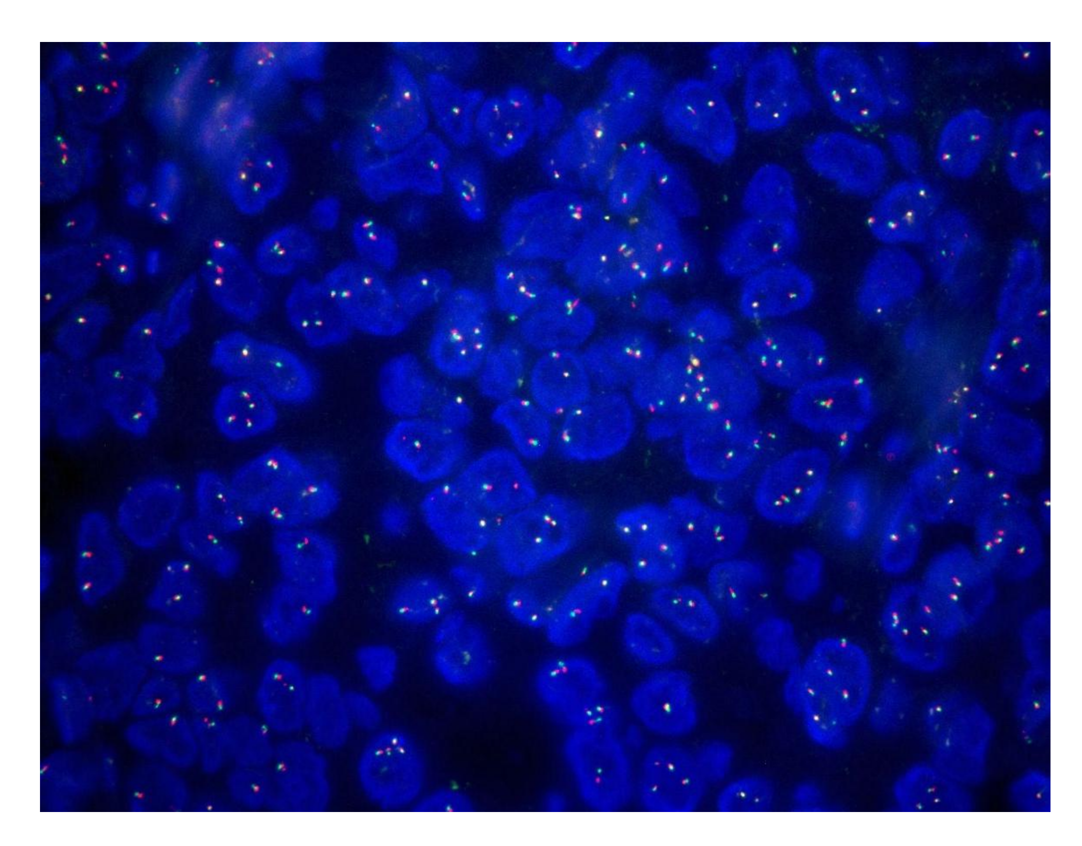
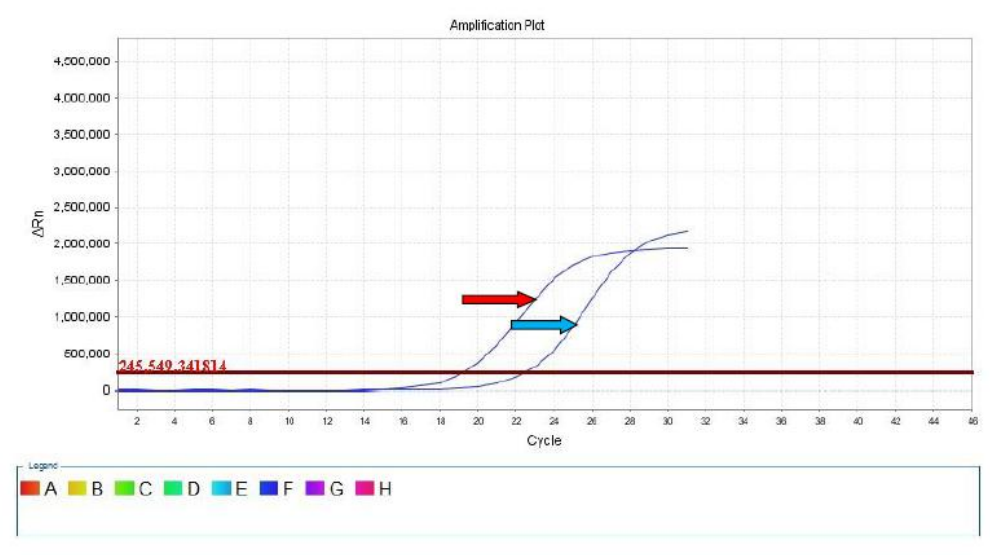


图 11 结直肠癌病例中 NTRK1 融合基因 FISH 检测未发现阳性信号（x1000）



红箭头:阳性对照　蓝箭头:样本突变曲线 Ct 值 22.6　横线为阈值曲线

图 12 部分 BRAF 免疫组化阳性表达的结直肠癌病例中检测到 BRAF V600E 基因突变。

表 1. 西藏地区结直肠癌中 PD-L1 表达抢矿与相关参数之间的关系

临床特征	N	PD-L1		X^2	P
		<10 n(%)	≥10 n(%)		
性别					
男	35	30（85.71）	5（14.29）	1.010	0.315
女	29	22（75.87）	7（24.14）		
年龄					
≤60	38	31（81.59）	7（18.42）	0.007	0.935
>60	26	21（80.77）	5（19.23）		
原发部位					
左半	22	15（68.18）	7（31.82）	4.520	0.104
右半	24	20（83.33）	4（16.67）		
直肠	18	17（94.44）	1（5.56）		
病理分型					
中/高分化腺癌	35	30（85.71）	5（14.29）	2.742	0.254
低分化腺癌	25	18（72.00）	7（28.00		
其他（未分化等）	4	4（100）	0（0）		
T 分期					
T1+T2	11	7（63.64）	4（36.36）	1.489	0.222
T3+T4	53	45（84.91）	8（15.09）		
N 转移					
有	24	22（91.67）	2（8.33）	1.750	0.186
无	40	30（75.00）	10（25.00）		
错配修复					
突变	10	4（40.00）	6（60.00）	10.223	0.001
无突变	54	48（88.89）	6（11.11）		
PD-1					
<10%	45	42（93.33）	3（6.67）	11.979	0.001
≥10%	19	10（52.63）	9（47.37）		
P53					
突变型	35	30（85.71）	5（14.29）	1.010	0.315
野生型	29	22（75.86）	7（24.14）		

参 考 文 献

[1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin. 2021,71(1):7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.

[2] International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020[EB/OL]. [2021-01-10]. https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/.

[3] Di J, Yang H, Jiang B, et al. Whole exome sequencing reveals inter tumor heterogeneity and distinct genetic origins of sporadic synchronous colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2018,142(5):927-939. DOI: 10.1002/ijc.31140

[4] Druliner BR, Ruan X, Sicotte H, et al. Early genetic aberrations in patients with sporadic colorectal cancer[J]. Mol Carcinog. 2018,57(1):114-124. DOI: 10.1002/mc.22738.

[5] WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO classification of tumours of the digestive system [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019:157-188.

[6] 白杨，吴林林，安建多，等. 结直肠癌组织中KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA基因突变与临床病理特征及MMR蛋白、p53蛋白表达的相关性研究[J]. 诊断病理学杂志，2021,28(3):183-188. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8096.2021.03.005.

[7] Kim KM, Ahn AR, Park HS, et al. Clinical significance of p53 protein

expression and TP53 variation status in colorectal cancer[J]. BMC Cancer. 2022,22(1):940. doi:10.1186/s12885-022-10039-y.

[8]Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation[J]. Int J Cancer. 2001,92(3):338-341. doi:10.1002/ijc.1189.

[9] 罗含欢，霍真，边巴扎西等.西藏地区手术切除结直肠癌病理类型及错配修复蛋白、人表皮生长因子受体 2、Pan-TRK 表达和 Eostein-Barr 病毒感染情况分析[J].中国医学科学院学报，2023,45(03):422-428. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.15343.

[10]郭涛，辛振，王富豪. 卵泡素样 3 基因在结肠癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 实用医学杂志.2021,37(22): 2871-2876.DOI:10.3969/j.issn.1006.

[11] Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis[J]. BMJ, 2018,362: K3529. DOI:10.1136/bmj.k3529.

[12] Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, et al. Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape[J]. Cancer Immunol Res. 2017,5(2):106-117. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-16-0391.

[13] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy[J]. Cell. 2017,168(4):707-723. DOI:10.1016/j.cell.2017.01.017.

[14]邢玉斐，潘雪，钱斌，等. 晚期非小细胞肺癌患者外周血 PD-1 和 PD-L1 分子的表态及其意义[J]. 中华医学杂志，2019,99(2):111-114. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.02.007.

[15]乔梦，蒋涛，赵沙，等. PD-1/PD-L1 抑制剂联合其他方式治疗在非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J]. 肿瘤，2017,37(06):663-669. DOI: 1000-7431 (2017) 06-0663-07.

[16]王超，郑绘霞. MSI,PD-L1 及 IL-6 在结直肠腺癌中的表达及意义[J].中国医学创新，2018，015(026):36-40. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2018.26.009

[17]刘宗航,史丽芸,郑立锋,等.PD-1/PD-L1 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J].中国临床研究，2019，32(10):4. DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2019.10.015.

[18] Zhai Z, Yu X, Yang B, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targetedtherapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 64:107-115. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.08.033.

[19]陈功，王峰. 结直肠癌分子检测高通量测序中国专家共识[J]. 临床肿瘤杂志，2021,26(3):253-264. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2021.03.011.

[20]陈海霞，何亚楠，王维娜，等. 结直肠癌组织中 KRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征及预后的关系[J]. 现代肿瘤医学，2021,29(4):626-631. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.04.017.

[21] Palomba G, Doneddu V, Cossu A, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS,

BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study[J]. J Transl Med,2016,14(1):292. DOI: 10.1186/s12967-016-1053-z.

[22] Lai E, Pretta A, Impera V, et al. BRAF-mutant colorectal cancer, a different breed evolving[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018,18(6):499-512. DOI: 10.1080/14737159.2018.1470928.

[23] Ye ZL, Qiu MZ, Tang T, et al. Gene mutation profiling in Chinese colorectal cancers patients and its association with clinicopathological characteristics and prognosis[J]. Cancer Med, 2020,9(2):745-756. DOI: 10.2139/ssrn.3405556.

[24]林志坚,徐韫健,温广明.KRAS,NRAS,BRAF 及 PIK3CA 基因突变与结直肠癌患者临床病理特征的关系[J].中华临床实验室管理电子杂志, 2021, 9(4):5. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2021.04.005.

[25]郑茗嘉,郑强,王悦,等. SMARCA4 缺失的原发性胸部肉瘤的临床病理特征[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(7):6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.07.007.

[26]张婉秋,吴海波.胃食管交界和胃的SMARCA4(BRG1)缺失型未分化癌临床病理学分析[J]. 诊断病理学杂志,2023,30(03):248-252. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8096.2023.03.010.

[27] Chang B, Sheng W, Wang L, et al. SWI/SNF complex-deficient undifferentiated carcinoma of the gastrointestinal tract: clinicopathologic study of 30 cases with an emphasis on variable

morphology, immune features, and the prognostic significance of different SMARCA4 and SMARCA2 subunit deficiencies[J]. Am J Surg Pathol, 2022,46(7):889-906. DOI：10.1097/PAS.0000000000001836.

[28] Velut Y, Decroix E, Blons H, et al. SMARCA4-deficient lung carcinoma is an aggressive tumor highly infiltrated by FOXP3+ cells and neutrophils[J]. Lung Cancer. 2022 , 169:13-21. DOI: 10.1016/j.lungcan.2022.05.001.

[29] Armon S, Hofman P, Ilié M. Perspectives and Issues in the Assessment of SMARCA4 Deficiency in the Management of Lung Cancer Patients[J]. Cells. 2021, 10(8):1920. DOI: 10.3390/cells10081920.

[30]施一翔,刘敬禹,江旭等.Ki-67、p53及拓扑异构酶-Ⅱ对结直肠癌肝转移患者预后的价值[J].海军医学杂志,2020,41(01):51-55. DOI: CNKI:SUN:HJYX.0.2020-01-018.

[31]常守凤,党雅梅,张晓玲,等.结直肠癌组织的PD-L1水平和P53突变情况及临床意义分析[J].临床肿瘤学杂志, 2022, 27(12):1119-1123. DOI:1009－0460(2022) 12－1119－05

[32] Li J , Wang J , Su D ,et al.p53 Immunohistochemistry Patterns Are Surrogate Biomarkers for TP53 Mutations in Gastrointestinal Neuroendocrine Neoplasms[J].Gastroenterology research and practice, 2021: :2510195. DOI:10.1155/2021/2510195.